



University of Groningen

Three dimensional structure of procine pancreatic prophospholipase A2

Zwart-Vessies, Johanna Catharina Antonia

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version

Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:

1977

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):

Zwart-Vessies, J. C. A. (1977). Three dimensional structure of procine pancreatic prophospholipase A2. s.n.

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

charge, that
by the imida-
ces a proton to
the amino acid
hydrolysis of the
amino acid se-

A_2 .
ase A_2 towards
ood after the
ne phospholipase
completed.

SAMENVATTING.

De drie-dimensionale structuur van het profosfolipase A_2 uit de varkenspancreas is bepaald tot een oplos- send vermogen van 3\AA door middel van röntgendiffractie aan kristallen van dit eiwit.

Profosfolipase A_2 .

Profosfolipase A_2 is de precursor van het vetsplit- sende enzym fosfolipase A_2 , dat van 3-*sn*-fosfoglycerides specifiek het C-2 vetzuur afsplitst. Het enzym komt zeer verspreid in de natuur voor. Het is o.a. aangetoond in slange- en bijegif en in weefsels van zoogdieren. In de zoogdieren wordt fosfolipase A_2 gemaakt in de pan- creas, niet direct als het aktieve enzym, maar als een precursor. Die precursor wordt vervoerd naar de twaalf- vingerige darm, waar ze o.i.v. trypsine wordt geakti- veerd doordat het peptide met de eerste zeven aminozu- ren van het profosfolipase A_2 wordt afgesplitst.

Het substraat van fosfolipase A_2 , de fosfolipiden, is niet zo goed oplosbaar in water. Boven een bepaalde concentratie vormen ze grotere aggregaten, micellen of liposomen. Het aktieve fosfolipase A_2 is goed in staat om fosfolipide moleculen in micellen te splitsen. Losse fosfolipide moleculen in water opgelost komen alleen voor als de concentratie ervan laag is en de vetzuur- staarten aan het lipide niet te lang zijn. Het aktieve fosfolipase A_2 kan ook die losse moleculen splitsen, maar veel minder efficiënt dan de moleculen in de mi- cellen. Het profosfolipase A_2 kan eveneens de losse moleculen splitsen, maar tegenover te moleculen in de micellen is de precursor inaktief. Waarschijnlijk is dus het aktieve centrum op het eiwit-molecuul al aan- wezig in de precursor, maar wordt het vermogen om mi- cellen te binden pas gevormd op het moment dat de pre- cursor wordt geactiveerd.

Struktuurbe-paling.

Voor de struktuurbe-paling van het profosfolipase A_2 werden kristallen gebruikt, die gegroeid zijn in een mengsel van 25% methanol (5mM $CaCl_2$) - 75% 0.02M tris-maleaat buffer pH=7.2. Er is vnl. één zwaar-atoom derivaat gebruikt, nl. het $K_3UO_2F_5$ derivaat; ook de anomale verstrooiingsverschillen veroorzaakt door het uranium zijn gebruikt. De struktuur is bepaald tot een oplossend vermogen van 3\AA . In een optisch modelbouwapparaat is een model van het eiwitmolecuul gebouwd.

Beschrijving van de struktuur.

Profosfolipase A_2 bestaat uit één polypeptideketen van 131 aminozuren, met daarin 7 S-S bruggen. Driedimensionaal ziet het eiwit er min of meer uit als een doosje met afmetingen van ongeveer $25 \times 28 \times 35\text{\AA}$. De zeven aminozuren die bij de aktivering van het eiwit door trypsine worden afgesplitst zitten als een staartje aan de buitenkant van het molecuul. Trypsine kan de binding $Arg_{-1}-Ala_1$ gemakkelijk bereiken. In het molecuul zitten geen regelmatige strukturen, zoals α -helices of β -strukturen. Vier van de zeven S-S bruggen zitten in een vlak midden door het molecuul; de andere drie zitten aan de buitenkant. Bij vergelijking van de aminozuurvolgordes van verschillende fosfolipases A_2 (die onderling zeer homoloog zijn) blijkt dat vijf van deze S-S bruggen conservatief zijn, waaronder de vier in het vlak door het molecuul.

Enzymatische aktiviteit.

Van His_{48} is biochemisch aangetoond dat het zich bevindt in het aktieve centrum van (pro)fosfolipase A_2 . Verder moeten zich in de buurt van His_{48} een Ca^{2+} -ion en één of meer tyrosine-zijketens bevinden. In de elektronendichtheidsverdeling vonden we in de buurt van His_{48} een dichtheid die we interpreteerden als een Ca^{2+} -ion. Dit ion is gebonden aan de zijgroep van Asp_{99} . Verder is de zijgroep van Tyr_{29} min of meer evenwijdig aan

de imidazool ring van His₄₈.

Voor de splitsing van losse moleculen van fosfolipiden hebben we het volgende mechanisme voorgesteld: Het fosfaatdeel van het substraat wordt gebonden aan het Ca²⁺-ion en de zijgroep van Arg₁₀₀; de C=O groep naast de te splitsen binding wijst naar His₄₈; en de beide vetzuurketens binden hydrofoob aan een nogal hydrofoob deel op het oppervlak van het eiwit. Naar analogie met andere estersplitsende enzymen veronderstellen we dat de splitsing als volgt verloopt: De zijgroep van Asp₄₉ (+evt. een water molecuul) zorgt voor een nucleofiele aanval op de carbonyl koolstof van het substraat. De negatieve lading die dan ontstaat op het zuurstof atoom wordt gecompenseerd door de imidazool ring van His₄₈; uiteindelijk verzorgt Tyr₂₉ de protonering van het glycerol-gedeelte van het substraat. Alle groepen, betrokken bij de binding en splitsing van het substraat zijn conservatief in de aminozuurvolgorde van de verschillende fosfolipases A₂.

Over de oorzaak van de veel grotere aktiviteit van actief fosfolipase A₂ t.o.v. substraat in micellen is in dit stadium nog niet veel te zeggen; daarvoor is de structuur van actief runderfosfolipase A₂ nodig, die nu wordt bepaald.